

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06072959 A**

(43) Date of publication of application: **15.03.94**

(51) Int. Cl

C07C 69/587
C12P 7/64

(21) Application number: **03133762**

(22) Date of filing: **28.03.91**

(71) Applicant: **AGENCY OF IND
SCIENCE & TECHNOL BOOSOO
YUSHI KK**

(72) Inventor: **KOSUGI YOSHIJI
SHIRAKI MASARU
AZUMA NAOTERU**

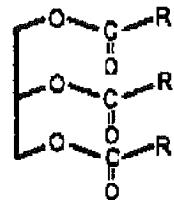
**(54) EICOSAPENTAENOIC ACID TRIGLYCERIDE AND
ITS PRODUCTION**

(57) Abstract:

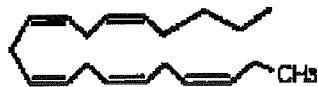
PURPOSE: To provide the subject novel compound useful for the prevention of circulatory diseases such as hypercholesterolemia and thrombosis, for medical experiments, for the research of physiological functions, etc.

CONSTITUTION: A compound of formula I (R is group of formula II). The compound of formula I is obtained by mixing eicosapentaenoic acid triglyceride with glycerol in a prescribed ratio, and subsequently simultaneously performing the contact reaction of the prepared substrate with an immobilized lipase and the dehydrative treatment of the reaction solution.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio



I



II

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-72959

(43)公開日 平成6年(1994)3月15日

(51)Int.Cl.⁵
C 0 7 C 69/587
C 1 2 P 7/64

識別記号
C 0 7 C 69/587
C 1 2 P 7/64

府内整理番号
8018-4H
9282-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 有 請求項の数 8 (全 6 頁)

(21)出願番号

特願平3-133762

(22)出願日

平成3年(1991)3月28日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成3年3月15日
社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌65巻
03号」に発表

(71)出願人 000001144

工業技術院長

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(74)上記1名の復代理人 弁理士 北村 和男 (外1
名)

(71)出願人 390014557

ボーソー油脂株式会社

東京都中央区日本橋本町1丁目1番8号

(74)上記1名の代理人 弁理士 北村 和男

(72)発明者 小杉 佳次

茨木県つくば市東1丁目1番3号 工業技
術院微生物工業技術研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エイコサペンタエン酸トリグリセリド及びその製造法

(57)【要約】

【目的】 エイコサペンタエン酸トリグリセリドの提供
とその製造法にある。

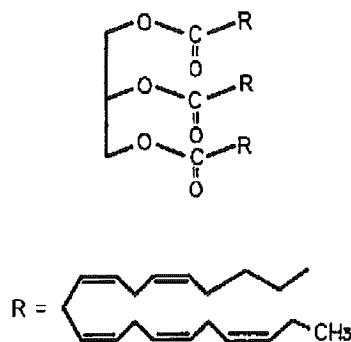
【構成】

【化1】に示す化学構造式を有するエイコサペンタエン
酸トリグリセリド。エイコサペンタエン酸とグリセリン
とから成る基質を固定化リバーゼにより接触反応させる
と同時に該反応液の脱水処理を行うことを特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記化 1 に示す構造式で示されるエイコサペンタエン酸トリグリセリド。

[化1]



【請求項2】 図1及び図2に示す¹ HNMRスペクトラム及び図3に示すFT-IRスペクトラムを有する請求項1記載のエイコサペンタエン酸トリグリセリド。

【請求項3】 エイコサペンタエン酸トリグリセリドと
グリセリンとを所定の割合で混合して基質を調製し、該
基質と固定化リバーゼとの接触反応とその反応液の脱水
処理とを同時に行うことを特徴とするエイコサペンタエ
ン酸トリグリセリドの製造法。

【請求項4】 請求項3記載の製造法で得られたエイコサペンタエン酸トリグリセリドを高濃度に含有する反応生成物に対し夾雑物の除去と精製処理を行うことを特徴とするエイコサペンタエン酸トリグリセリドの製造法。

【請求項5】 該基質は、エイコサペンタエン酸と該エイコサペンタエン酸に対し9～11重量%のグリセリンとから成る請求項3記載のエイコサペンタエン酸トリグリセリドの製造法。

【請求項6】 該固定化リバーゼの初期含水量は、1.3～8.3%であり、該基質の初期水分濃度は、約50～8000 ppmであり、反応温度は40℃以上、一般に、30～60℃であり、又、該反応液の該脱水処理は、真空脱水方式又は乾燥不活性ガスの通気方式で行い、反応系内を100 ppm以下の水分濃度の超微水系を維持するようにすることを特徴とする請求項3記載のエイコサペンタエン酸トリグリセリドの製造法。

【請求項7】 該固定化リバーゼは、ムコール属又はキヤンディダ属のリバーゼを固定化したものである請求項3又は6記載のエイコサペンタエン酸トリグリセリドの製造法。

【請求項8】 該反応生成物の夾雜物の除去、精製処理は、塩基性アルミナカラム或いはシリカゲルから成る液体クロマトグラフによる夾雜物の吸着と溶剤による該エイコサペンタエン酸トリグリセリドの溶出、溶出液の蒸散を行うエイコサペンタエン酸トリグリセリドの製造法。

【発明の詳細な説明】

[0001]

【産業上の利用分野】本発明は、エイコサペンタエン酸トリグリセリド及びその製造法に関する。

[0 0 0 2]

【従来の技術】従来、 $\omega-3$ 系高度不飽和脂肪酸は、サバ、イワシなどの魚油等の海産食品に多く含まれ、これが人体に摂取され、コレステロールの低下、抗血栓症などに有用な物質として健康食品として利用され、医学的な応用にも注目されているが、酸化され易く、変質、劣化し、非常に高価なものである。又、そのエチルエステルは知られているが、トリグリセリドより生理活性が劣るとされている。 $\omega-3$ 系高度不飽和脂肪酸を摂取するには、トリグリセリドが理想的であるとの報告がある。

(Carol M. Hoenzski et al. B.
iochim. Biophys. Acta 1081
(1991) 33~38)

更に一方、エイコサペンタエン酸、リノレン酸などのトリグリセリド混合物の $\omega-3$ 系高度不飽和脂肪酸濃縮物も公知であるが、オレイン酸、リノール酸などの $\omega-6$ 系高度不飽和脂肪酸トリグリセリドが含まれているため、脂肪過多の患者には、純粹な $\omega-3$ 系高度不飽和脂肪酸トリグリセリドが必要である。又、リバーゼによる高度不飽和脂肪酸のグリセリド合成について検討され、その研究報告がある。〔第29回油化学討論会・油化学研究発表会講演要旨集P192(1990)〕。これによれば、リバーゼT O Y O 、リバーゼO F の2種類のリバーゼを夫々の酸素液に使用し、 α -リイレン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸などの各高度不飽和脂肪酸単独とグリセリンとを各酵素と反応させてそ
30 の夫々のグリセリドを合成したものである。

【0 0 0 3】

【発明が解決しようとする課題】上記のように、従来の技術では、固定化リバーゼにより $\omega-3$ 系高度不飽和脂肪酸のトリグリセリドを高濃度に収得することができなかつた。即ち、前記に報告されたグリセリドの合成法によつても、その固定化リバーゼを最適条件下においてさえ、而もその生産物中に食用に適さない遊離脂肪酸を 10 ~ 20 % 含んでゐる。その上、リバーゼ T O Y O では 26 ~ 38 % の、リバーゼ O F では 18 ~ 33 % のトリグリセリドの合成率しか達成できず、これでは、そのトリグリセリドを単品とすることができず、機能性食品その他の分野に、例えば、医学用に、食品への添加物などとして利用する製品として得ることができない。特に、 $\omega-3$ 系高度不飽和脂肪酸として代表的なエイコサペンタエン酸のトリグリセリドを高収率に製造でき、又単離することができることが望まれる。

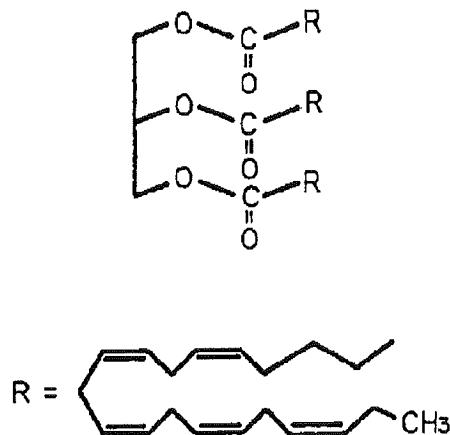
[0004]

【課題を解決するための手段】本発明は、上記従来の課題を解決し、上記の要望を満足したもので、機能性食品などとして極めて有効なエイコサペンタエン酸トリグリ

セリドを提供したもので、下記の化学構造式で示され、且つ添付図面の図1及び図2に示す⁻¹HNMRスペクトラム及び図3に示すFT-IRスペクトラムを有する。

[0 0 0 5]

【化 1】



【0006】更に、本発明は、上記のエイコサペンタエン酸トリグリセリドを高収率に得る製造法に係り、エイコサペンタエン酸とグリセリンとを所定の割合で混合して基質を調製し、該基質と固定化リバーゼとの接触反応とその反応液の脱水処理とを同時にを行うことを特徴とする。

[0 0 0 7]

【作用】本発明の上記物質は、エイコサペンタエン酸エチルエステルより吸収性が良好であった。本発明の上記物質の製造法によれば、該基質を固定化リバーゼと反応させると同時に脱水処理を行うので、70%以上のエイコサペンタエン酸トリグリセリドを含む反応生成物が得られるので、工業生産が可能となり、又、これから夾雑物を除去して99%の純度の該エイコサペンタエン酸トリグリセリドを得ることができる。

【0008】上記の製造法において、該エイコサペンタエン酸トリグリセリドを高収率に得る好ましい条件は、基質として、該エイコサペンタエン酸に対し9～11重量%のグリセリンから成るものが好ましい。又、固定化リバーゼの初期含水量は、1、3～8、3%であり、該基質の初期水分濃度は、約50～8000 ppmであり、反応温度は40℃以上、一般に30～60℃である。又、脱水処理は、真空脱水方式又は乾燥不活性ガスの通気方式で行い、これにより反応系内を1000 ppm以下の水分濃度の超微水系を保持することにより、この場合、固定化リバーゼとして、ムコール属又はキャンディダ属のリバーゼが特に最適である。尚、上記の反応生成物からのエイコサペンタエン酸トリグリセリドの分離、精製は、該反応生成物を塩基性アルミナカラム或いはシリカゲルから成る液体クロマトグラフを用い、夾雑物を除き、その溶出液を蒸発することにより

遂行され、純度99%の精製品が得られる。

[0 0 0 9]

【実施例】次に本発明の実施例を詳述する。原料として、従来法など所望の方法で単離した或いは市販のエイコサペンタエン酸とグリセリンを用意する。その両者の配合割合は、通常、化学量論量又はその付近である。通常エイコサペンタエン酸に対し9～11重量%のグリセリンを配合した基質を調製する。

【0010】該基質に作用させる固定化リバーゼは、初期含水量1.3~8.3%が好ましく、又該基質の初期水分濃度は、約50~8000ppmが好ましい。固定化リバーゼとしては、リバーゼSP382 (Candida属リバーゼを固定化したもの)、リバーゼA (Aspergillus sp.) を固定化したもの、リバーゼTOYO (Chromobacterium viscosum) を固定化したもの、ムコール属のリバーゼ、例えば、リポザイムIM60 (Mucor mieheiのリバーゼを固定化したもの) などが使用できるが、好ましくは、ムコール属又はキャンディダ属のリバーゼを固定化したものである。該リポザイム及びリバーゼSP382はノボ社製のものであり、水分含有量が100ppm以下で活性を維持できる。リバーゼの種類によっては、レシチンやポリオールなどの存在下にリバーゼを固定すれば、超微水系でも活性が維持できる。

【0011】かくして、該基質を該固定化リバーゼに作用させるのであるが、この場合、適宜の装置が使用できる。又、先に発明者が特願平2-307214号で提示した「高酸価油の精製法」で用いた各種の装置が利用できる。即ち、その所望の装置を使用して、該基質を該固定化リバーゼと接触反応させるが、この場合、同時にその反応液の脱水処理を行うことが重要であり、これにより約70~80%の高含有のエイコサペンタエン酸トリグリセリドを合成することができる。

【0012】この合成を確保するには、その脱水速度は、該エイコサペンタエン酸の減少速度の100.1%以上になるように脱水し乍ら、反応液を固定化リバーゼに繰り返し接触させることにより、反応と脱水処理を連続的に行なうことが良い。この脱水処理を行なうには、真空脱水方式或いは乾燥不活性ガスの通気である。而して、その反応系内を100ppm以下の水分濃度に保持するように脱水処理を行なうことが好ましい。

【0013】尚、この場合の反応温度は、40℃以上、一般に30～60℃の範囲とし、これにより、酵素反応の効率性が特に良い。最適温度は40～60℃である。かかる温度範囲で目的とする生産物、該エイコサペンタエン酸トリグリセリドの二重結合の移動などを防止することができる。装置は、クローズト型連続製造装置が好ましく、リアクター内の酸素を、窒素、アルゴン等の不活性ガスで置換し、大気中の酸素が反応物質に触れないように、不活性ガス雰囲気下で反応させることが好まし

く、これにより、過酸化物の上昇が防止される。

【0014】次に、更に詳細な実施例につき説明する。

【実施例1】容器中の大気を窒素で置換した反応容器に、エイコサペンタエン酸0.3gとグリセリン0.0305g及び固定化リバーゼSP382を0.03g加え、10mmHg程度まで真空乾燥し、60℃で振とう反応させた。エーテル・エタノールで反応を停止させ、反応生成物をGPCカラムを装備した高速液体クロマトグラフで測定した。反応46時間の該反応生成物には、75.2%のエイコサペンタエン酸トリグリセリドが得られた。残りは、22.3%のエイコサペンタエン酸ジグリセリド及び2.5%のエイコサペンタエン酸モノグリセリドであった。

【0015】【実施例2】容器中の大気を窒素で置換した反応容器に、エイコサペンタエン酸1gとグリセリン0.1g、リボザイムIM60を0.05g加え、750mmHg程度脱気し真空乾燥し乍ら、60℃で振とう反応した。5mLのエーテル-エタノール(1:1)に4滴の反応生成物液をとり反応を停止させた。該反応停止させた反応生成物をGPCカラムを装備した高速液体クロマトグラフで測定した。反応時間48時間の該反応生成物には、81%のエイコサペンタエン酸トリグリセリドが検出され、残りはエイコサペンタエン酸ジグリセリドであった。反応72時間では、エイコサペンタエン酸トリグリセリド83%、エイコサペンタエン酸ジグリセリド17%であった。

【実施例3】容器中の大気を窒素で置換した反応容器に、エイコサペンタエン酸0.5gとグリセリン0.05g、リボザイムIM60を0.05g加え、750mMg程度脱気し真空乾燥し乍ら、40℃で振とう反応した。反応時間94時間のサンプルには、76%のエイコサペンタエン酸トリグリセリドが検出され、残りはエイコサペンタエン酸ジグリセリド20%、エイコサペンタエン酸4%であった。反応192時間では、エイコサペンタエン酸トリグリセリド83%、エイコサペンタエン酸ジグリセリド17%であった。

【0016】一般に、このように本法の処理により、約70~85%のエイコサペンタエン酸トリグリセリドを含有する反応生成物が得られ、夾雑物として大部分がエイコサペンタエン酸ジグリセリド、エイコサペンタエン酸モノグリセリド、微量の過酸化物である。かかる反応生成物を下記のようにして99%の高純度のエイコサペンタエン酸トリグリセリドの精製品が得られる。

【0017】上記の反応を停止させた反応生成物をエー

テルに溶かし、塩基性アルミナカラムから成る液体クロマトグラフにより該夾雑物を吸着除去する一方、エイコサペンタエン酸トリグリセリドを溶出し、その溶出液を蒸散させて高純度の99%の精製品を得た。或いは、該反応生成物をヘキサンに溶かし、シリカゲルカラムから成る液体クロマトグラフにより、該夾雑物を吸着させた後、ヘキサンとエーテル(95:5)混液で溶出させ、その溶出液を蒸散させて99%の高純度の精製品を得た。

【0018】次に、その精製法の実施例を詳述する。実施例2で得られた反応生成物をジエチルエーテルに溶かし固定化酵素を濾別した後、塩基性アルミナカラムにかけた。塩基性アルミナカラムは、活性度を調節したアルミニウムオキシド90(メルク 製品番号1076)を4g充填したもので3本用意し、3度のクロマトを行つた。溶出液は、窒素を吹き込んでエーテルを飛ばし、アルゴンガス中-60℃で保存した。得られたエイコサペンタエン酸トリグリセリドは、キャビラリーガスクロマトグラム(WCOT CP-S1188)及びHPLCカラム(Shodex GPC KF-802 300×3)にて純度が99%以上であることを確認した。

【0019】この精製品につき、¹HNMR(JEOL JNH-GSX500型)及びIR分析(JEOL JIR-100)を行つた。その結果は図1及び図2及び図3の如くである。即ち、図1示のNMRスペクトルのメインピークa-hと図1示の化学結合との帰属関係がエイコサペンタエン酸トリグリセリドと完全に一致することが解る。ピークの大きさから判定される水素原子数は、f, gの大きさを4, 000として計算すると、これも理論値とほぼ一致した。更に詳述すれば、エイコサペンタエン酸トリグリセリドのCDCL₃を溶媒とした¹HNMRではメインピークは図2示の如くである。即ち、化学シフトδ5.37, 4.29, 4.15, 2.84, 2.80, 2.33, 2.08, 1.69, 0.97ppmにピークがあり、それらの帰属は図1の如くである。一方、NaCl板に塗布したFT-IRスペクトルでは図3の如く、3012cm⁻¹にCHの吸収、1745cm⁻¹にエステルC=Oの吸収、1653cm⁻¹にC=Cの吸収、1144cm⁻¹にC-Oの吸収があり、これらの存在が確認された。尚、プロトピーク面積強度は、下記表1の通りであった。

【0020】

【表1】

	本法図1より	理 論 値	相対誤差 (%)
h	30.358	31.0	2.0
f + g	4.000	4.0*	0.0
e	23.441	24.0	2.3
d	5.886	6.0	1.9
c	11.888	12.0	0.9
b	5.902	6.0	1.6
a	8.718	9.0	3.1
合計	90.19	92.0	1.9

* $\text{f} + \text{g}$ プロトン4個分と仮定する

【0021】表1より明らかな如く、 $f + g$ を基準とするとその他のピークは1~3%理論値より弱い。積分強度の理論誤差は、通常数~5%以下と考えられるので、この範囲は誤差の範囲内であることが判る。以上の測定結果より、該精製品は、化1に示す構造式を有するエイコサペンタエン酸トリグリセリドであることを特定した。

【0022】更に、該精製品は、下記の構造と理化学特性を有する。即ち、その元素組成は、炭素、酸素、水素である。ガスクロマトグラフィーのキャピラリーカラムによる溶出パターンより構成脂肪酸は、エイコサペンタエン酸のみである。又、高速液体クロマトグラフィーのGPCカラム(ケルバーションカラム)による溶出位置及びNMRのプロトン強度と帰属から推定される構造式より、分子量は945.4である。 -40°C においても液体状態であり、ヘキサン、エーテル、アセトンに可溶な無色透明な物質であり、塩基性アルミニカラムを素通りするので、中性を示す脂肪である。シリカゲル薄層クロマトグラフィーのスポットは、ヨウ素蒸気下で褐色に発色する。

【0023】

【発明の効果】このように本発明により得られるエイコサペンタエン酸トリグリセリドは、精製品であるから、エイコサペンタエン酸の生理機能の研究、コレステロールの低下、抗血栓症などの循環器系疾病の予防、医学実験用などに有効であり、又、更にその生理的活性が解明されることにより、医薬品としての利用の可能性を有し、更に又、その所定量を食品などに機能性食品として適確に添加でき、又必要に応じ、又、ω-6系高度不飽

20 和脂肪酸トリグリセリドとのバランスをとるなどに有用であるなどの効果を有する。更に、本発明の製造法によれば、エイコサペンタエン酸とグリセリンの所定割合から成る基質を固定化リバーゼにより反応させると同時に、該反応液の脱水処理を行うようにしたので、著しく高収率にエイコサペンタエン酸トリグリセリドを製造することができる効果を有する。而して、かゝるエイコサペンタエン酸トリグリセリドを高濃度に含有する反応生成物が得られるので、これから夾雑物を分離し、生成することができる効果を有する。更に、上記の製造法において、基質として該エイコサペンタエン酸に対し9~11重量%のグリセリンを配合した基質を使用し、固定化リバーゼにより、特に、ムコール属又はキャディダ属のリバーゼにより、30~60℃の温度で反応させると共に脱水処理を反応系内が100ppm以下の超微系を維持するように行うときは、上記の高収率の生産が適確に得られ、又その精製法として、液体クロマトグラフによる夾雑物の除去する一方、該エイコサペンタエン酸トリグリセリドの溶出を行うとき、高能率に99%の精製品が得られる効果をもたらす。

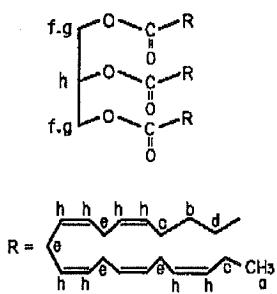
【図面の簡単な説明】

【図1】及び

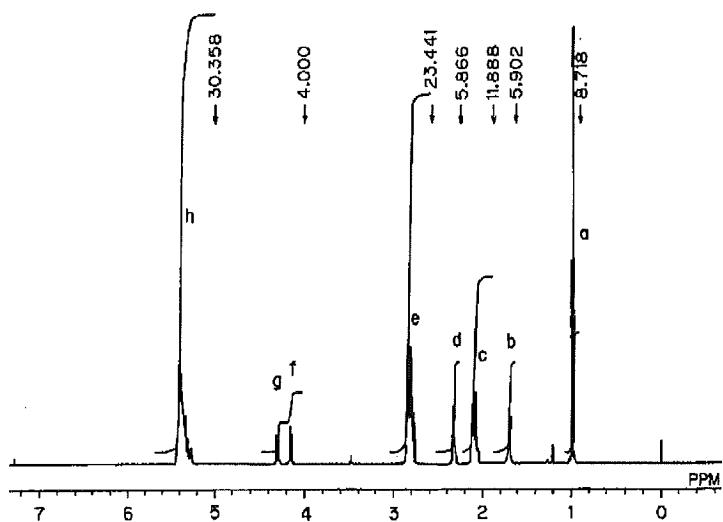
【図2】 エイコサペンタエン酸トリグリセリドの ^1H NMRスペクトラム及びそのメインピークの帰属を表す図である。

【図3】 エイコサペンタエン酸トリグリセリドのFT-IRスペクトラムの図である。

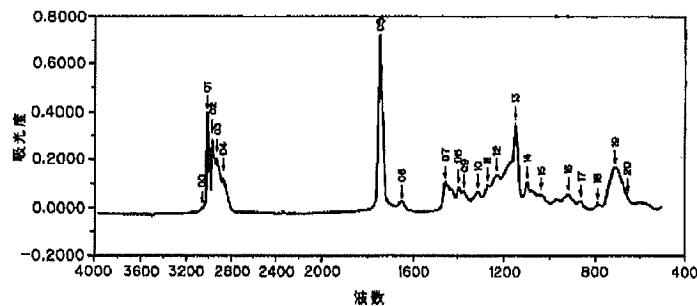
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 白木 勝

茨木県つくば市東1丁目1番3号 工業技術
科学院微生物工業技術研究所内

(72)発明者 東 直輝

千葉県船橋市日の出2丁目17番1号 ポー
ソーオ油脂株式会社内